TNK 103/01

(19) Republik Österreich Patentamt

(11) Nummer: AT 402 151 B

AS

(12) # PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1547/93

(22) Anmeldetag: 3. 8.1993

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1996

(45) Ausgabetag: 25. 2.1997

(51) Int.Cl.[6] : A61K 35/12
C12N 7/06

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0278487A2 US 5186945A EP 0345246A2

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

REDL GERDA DR.
RUTZENDORF, NIEDERÖSTERREICH (AT).
SEELICH THOMAS DR.
WIEN (AT).
TURECEK PETER DR.
WIEN (AT).
WÖBER GÜNTER
OBERWALTERSDORF, NIEDERÖSTERREICH (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES VIRUSSICHEREN BIOLOGISCHEN PRÄPARATES

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates, wobei das Präparat in wässeriger Lösung oder - gebunden an einen festen Träger - in Suspension in Gegenwart eines Tensids erhitzt wird.

Weiters betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Virusinaktivierung von biologischen Präparaten bzw. zum Stabilisieren dieses Präparates während einer Hitzebehandlung.

AT 402 151 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates durch Erhitzen in Lösung. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann die Virussicherheit des Präparates unter Erhaltung der biologischen Aktivität erhöht werden.

Unter biologischen Präparaten versteht man Präparate biologischen Ursprungs, die beispielsweise aus Körperflüssigkeiten, wie Blut, oder Zellkulturen gewonnen werden können. Durch den Kontakt mit potentiell infektiösem Material besteht bei derartigen Produkten die Gefahr der Kontamination durch infektiöse Agentien.

Das Risiko der Übertragung von Viren durch Blutprodukte ist bekannt. Unter Blutprodukten werden Produkte aus menschlichem oder tierischem Blut, Plasma oder Serum verstanden, die zur therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Anwendung bestimmt sind. Solche Produkte können Enzyme, Proenzyme einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobuline, Albumine, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma enthalten.

Wässerige Proteinlösungen werden gemäß dem Verfahren der EP-0 278 487 mit bis zu 2 g/100 ml eines nichtionischen Detergens versetzt und anschließend bei niedriger Temperatur, beispielsweise 4 °C, solange inkubiert, bis ein virusinaktivierender Effekt erzielt wurde.

Gemäß der EP-0 050 061 wird gleichfalls ein pharmazeutisches Produkt mit Amphiphilen bei einer Temperatur zwischen 4 und 37 °C behandelt.

Diese Behandlung mit Detergentien hat jedoch den Nachteil, daß sie lediglich auf membranumhüllte Viren abzielt: Wenn ein Tensid in einer Konzentration über der mizellbildenden Konzentration (CMC) vorliegt, werden lipidhaltige Membranen solubilisiert und das Virus inaktiviert. Demgegenüber werden Viren, die an sich keine lipidhaltige Membran aufweisen, wie z.B. Hepatitis A-Virus, die aber in Lipidvesikeln eingeschlossen sein können, durch eine Tensidbehandlung freigesetzt und damit aktiviert anstelle von inaktiviert (siehe dazu Manucci PM et al. (1992), The Lancet 339, 819 "Outbreak of hepatitis A among Italian patients with haemophilia").

Oberflächenaktive Mittel werden gemäß der EP-B1-0 124 044 in einer Menge von 0,01 bis 0,5 Gew.% gemeinsam mit einem Polyol und einem chelatbildenden Mittel zu einer fibronectinhaltigen Lösung zugesetzt, die bei einer Temperatur von 50 bis 70 °C wärmebehandelt wird. Die geringen Mengen an oberflächenaktivem Mittel schützen Finbronectin während der mechanischen Behandlung vor Denaturierung.

Ebenso werden Detergentien als Lösungsvermittler gemeinsam mit virusinaktivierenden Mitteln zu Blutplasma zugesetzt, welches bei einer Temperatur bis zu 60 °C gehalten wird (US-PS 5 186 945). Um eine gewünschte oberflächenaktive Wirkung zu erzielen, werden sehr geringe Mengen an nichtionischen Detergentien eingesetzt, etwa in einer Konzentration von 0,001 bis 5 Gew.%. Der Vorteil der Verwendung dieser geringen Detergensmengen liegt darin, daß diese nicht entfernt werden müssen.

Es ist weiters in der EP-0 131 740 beschrieben, daß ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in einer Lösung mit organischen Lösungsmitteln bei einer Temperatur von 0 bis 70 °C durchgeführt werden kann. Als Benetzungsmittel kommen dabei 0,001 bis 10 Gew.% Detergentien zum Einsatz. Jedoch ist es erforderlich, die labilen Proteine bei Erhitzen der Lösung zu stabilisieren. Damit werden aber nicht nur das labile Protein stabilisiert, sondern auch die Viruskomponenten.

Ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in einem Produkt, das an eine feste Phase adsorbiert ist, ist auch in der EP-0 197 554 beschrieben. Das adsorbierte Produkt wird mit einem virusinaktivierenden Mittel in Kontakt gebracht, worauf die feste Phase abgetrennt und gewaschen wird. Zuletzt wird das Produkt wieder desorbiert. Als virusinaktivierendes Mittel ist unter anderem eine amphiphile Substanz beschrieben, die anionisch, kationisch, ampholytisch und nichtionisch sein kann. Die Behandlung kann jedoch nur bei einer Temperatur von 0 bis 50 °C vorgenommen werden.

Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches die Herstellung eines virussicheren Präparates enthaltend ein labiles Protein durch Erhitzen unter weitgehender Erhaltung der biologischen Aktivität ermöglicht.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß dem in wässeriger Lösung vorliegenden Präparat vor dem Erhitzen ein Tensid in einer hohen Konzentration mit mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% eines Tensids zugesetzt und das Tensid nach dem Erhitzen entfernt wird. Die erfindungsgemäß geeigneten Tenside können aus der Gruppe der nichtionischen, anionischen, kationischen oder zwitterionischen Tenside ausgewählt werden und sind vorzugsweise biologisch verträglich. Beispielsweise kann ein Tween®-(Polyoxyethylenderivate der Sorbinatester) oder Triton®-(z.B. Ethoxylate des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl(butyl)phenols oder Benzyltrimethyl(ammoniumhydroxid)) Tensid, Pluronic®-(Polyalkylenglykole auf der Basis von Blockpolymeren aus Ethylen- und Propylenoxid), N-Octylglucosid, Natriumdesoxycholat, Benzyltrimethylammoniumchlorid, Benzyldimethyl-2-hydroxyäthyleammoniumchlorid oder Sulfobetain®SB12 (N-Dodecyl-N'N-dimethylammonio-3-propansulfat) verwendet werden. Das erhaltene

Präparat zeichnet sich durch seinen geringen Anteil an Denaturierungsprodukten aus, da trotz Erhitzer mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 % der biologischen Aktivität des Präparates erhalten bleibt Dabei konnte beobachtet werden, daß die nach dem Erhitzen von hochkonzentrierten Proteinlösunger auftretenden Trübungen der Lösung ausbleiben. Die Extinktion E_{600} der erhitzten Lösung mit mindestens 5 Gew.% Proteingehalt beträgt weniger als 0,1 (bei einer Schichtdicke von 1 cm, Referenz: Wasser). Als Ergebnis wird also ein optisch klares Produkt, weitgehend frei von Denaturierungsprodukten erhalten.

Es hat sich herausgestellt, daß der Zusatz eines Lösungsvermittlers vor dem Erhitzen der Lösung vorteilhaft ist. Einer Faktor XIII haltigen Lösung kann beispielsweise Arginin zugesetzt werden, um der Effekt der Tensidwirkung auf die Reduktion der Trübungsbildung zu verstärken.

Die Hitzebehandlung wird bei einer Temperatur von 55 bis 65 °C, vorzugsweise bei etwa 60 °C, und während einer Zeitdauer, die ausreicht, eventuell vorhandene Viren zu inaktivieren, durchgeführt, vorzugsweise während 2 min bis 100 Stunden. Am meisten bevorzugt wird eine Behandlungsdauer von 30 min bis 10 Stunden. Die benötigte Zeitdauer des erfindungsgemäßen Verfahrens kann mit Hilfe von Modellviren wie HIV, Sindbis-, Polio-, FSME- und Vaccinia-Virus, in einem Vorversuch bestimmt werden. Ein vor dem Erhitzen zugesetztes Virus darf nach dem Erhitzen in der Lösung nicht mehr nachweisbar sein.

Obwohl eine Virus-Inaktivierungsmethode mittels Tensiden im Stand der Technik lediglich als wirksam gegen membranumhüllte Viren beschrieben wird, kann der gewünschte Effekt auch gegen nichtmembranumhüllte Viren erzielt werden, wenn das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt wird.

Eine wesentliche Denaturierung der Proteine im erfindungsgemäß erhitzten Produkt kann nicht festgestellt werden. Es war überraschend, daß hitzelabile Proteine durch die Anwesenheit von Tensiden sogar stabilisiert werden. Es ist daher möglich, labile Proteine erfindungsgemäß zu erhitzen und deren spezifische Aktivität aufrechtzuerhalten. Die Erhaltung der biologischen Aktivität während einer Hitzebehandlung ist vor allem bei hitzelabilen Proteinen von Bedeutung. Eine Behandlung von hitzestabilen Präparationen, beispielsweise einer Albumin-Präparation, ist jedoch weniger kritisch. Die Erfindung betrifft daher vor allem ein Verfahren zur Herstellung eines Präparates, das hitzelabile Proteine, ausgenommen Albumin, enthält.

Auf einen Zusatz üblicher Stabilisatoren, wie z.B. Polyole und/oder Aminosäuren oder deren Derivate, kann dabei verzichtet werden. Dies hat den Vorteil, daß die Virusinaktivierung rascher erfolgt und die Effektivität der Hitzebehandlung wesentlich besser ist. Die Entfernung der üblichen Stabilisatoren ist überdies aufwendig und kann somit vermieden werden.

So kann beispielsweise eine wässerige Lösung, enthaltend Blutgerinnungsfaktor XIII, erfindungsgemäß ohne Verwendung der üblichen Stabilisatoren erhitzt werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird die virusinaktivierende Wärmebehandlung an einem an einen festen Träger adsorbierten Präparat vorgenommen, wobei das adsorbierte Präparat beim Erhitzen in einer Lösung eines Tensids suspendiert ist. Nach dem Erhitzen kann das virusinaktivierte Präparat in bekannter Weise vom Träger getrennt werden. Blutfaktoren, wie Faktoren des Prothrombinkomplexes, werden beispielsweise an einem Ionenaustauscher oder an eine Affinitätsmatrix adsorbiert und in einer wässerigen Lösung in Anwesenheit hoher Tensidkonzentrationen suspendiert und erhitzt.

Die Erfindung umfaßt gleichermaßen ein Verfahren zum Erhöhen der Virussicherheit eines biologischen Präparates unter Erhaltung von mindestens 50 %, vorzugsweise 80 % der biologischen Aktivität, insbesondere der Virussicherheit gegenüber membranumhüllten und nicht-membranumhüllten Viren, wobei das Präparat in wässeriger Lösung bzw. in Suspension - gebunden an einen festen Träger - in Gegenwart eines gelösten Tensids in einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% erhitzt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich überraschenderweise auch zum Stabilisieren eines biologischen Präparats während einer Hitzebehandlung.

Das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt ausschließlich in wässeriger Lösung oder Suspension, die je nach Tensidkonzentration auch mehrphasig sein kann. Durch die hervorragende viruzide Wirkung der hochkonzentrierten Tenside kann auf die Verwendung organischer Lösungsmittel verzichtet werden. Das erfindungsgemäß behandelte Präparat enthält daher keine toxischen Spuren an organischen Lösungsmitteln.

Die Entfernung des erfindungsgemäß zugesetzten Tensids erfolgt mit an sich üblichen Methoden. Beispielsweise kann das behandelte Präparat an einem festen Träger adsorbiert und tensidfrei gewaschen werden. Die Präzipitation der zu präparierenden Proteine mit Fällungsmitteln, wie Ethanol, Ammoniumsulfat oder Polyethylenglykol, die Flüssigphasenextraktion oder die Phasentrennung durch Zusatz von bestimmten Substanzen, wie Mischungen von Salz und Polyethylenglykol oder löslichem Dextran, sowie die Festphasenextraktion von T nsid an C18-Material ("reversed phase chromatography") sind gleichermaßen geeignete Methoden zur Abtrennung zumindest des Großteils an Tensid vom Präparat. Durch die geeigneten Maßnahmen zur Entfernung des Tensids wird die Tensidkonzentration im Präparat vorzugsweise auf

weniger als 0,01 Gew.% reduziert.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele noch näher erläutert.

Beispiel 1: Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebunden m aktiviertem Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von Vaccinia-Virus)

15 mg DEAE-Sephadex A-50 (Fa. Pharmacia) wurden 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml einer Lösung von 30 g/l NaCl in Wasser zur Quellung inkubiert. Danach wurde das Gel durch Zentrifugation vom Quellüberstand abgetrennt. Anschließend folgten fünf Waschungen des Gels mit je 1 ml Puffer (9 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$, 7 g/l NaCl, pH 7,0) und weitere zwei Waschungen mit einem Puffer (7 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 7 g/l NaCl), wobei ebenfalls resuspendiert und zentrifugiert wurde.

30 ml frisch gefrorenes menschliches Citratplasma wurden bei 0 bis +4°C aufgetaut und das anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugation bei +2°C abgetrennt. Der daraus resultierende "Kryoüberstand" wurde mit dem gewaschen DEAE-Sephadex inkubiert, wobei FEIBA generiert und zusammen mit den Faktoren des Prothrombinkomplexes und inertem Protein an das Gel adsorbiert wurde. Danach wurde coadsorbiertes Inertprotein vom DEAE-Gel durch Waschen mit einem Puffer (9 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$, 7 g/l NaCl) entfernt.

Der pufferfeuchte Gel-Proteinkomplex wurde nun mit 1 ml Tween-80 10 min bei 60°C suspendiert, wobei zuvor 0,1 ml einer Vacciniavirussuspension zugesetzt wurden. Der Virustiter wurde nach 2, 4, 6, 8 und 10 min bestimmt. Die Suspension des Gel-Proteinkomplexes in Tween-80 wurde dann mit einer Lösung von 30 g/l NaCl in Wasser 1:10 verdünnt. Dabei wurde der Wirkstoff vom Gel eluiert. Das Tensid wurde aus dieser Lösung in bekannter Weise durch Adsorption mit einer Affinitätsmatrix für die Extraktion unerwünschter Tenside aus Protein-Lösungen (Extracti-Gel® D Detergent Removing Gel der Firma Pierce) entfernt. Die Lösung wurde nun gegen destilliertes Wasser dialysiert, eingefroren und lyophilisiert. Nach Rekonstitution des Lyophilisats wurde die FEIB-Aktivität gemäß der AT-350726 bestimmt.

Als Kontrolle dienten eine ebenso hergestellte Präparation von FEIBA, versetzt mit Virus, jedoch ohne Behandlung mit heißem Tensid, sowie eine Präparation ohne Tensid- und Hitzebehandlung.

Die Analysenergebnisse sind Tabelle 1 zu entnehmen.

TABELLE 1

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktiviertem Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (Vaccinia)

	Dauer der Behandlung (min.)					Eluat nach Lyophillisierung
	2	4	6	8	10	
mit Tween 80						
Virustiter (ml^{-1})	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	20
ohne Tween 80						
Virustiter (ml^{-1})	$10^{4.0}$	$10^{3.1}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung						
Virustiter (ml^{-1})	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{5.3}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24

n.b. nicht bestimmt

Beispiel 2: Hitzbehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktivierten Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von FSME-Viren)

FEIBA wurde analog zu Beispiel 1 hergestellt. Zur Behandlung des pufferfeuchten Gel-Proteinkomplexes mit Tween-80 wurden jedoch 0,1 ml einer FSME-Virussuspension zugesetzt. Der Virustiter wurde nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 7 und 10 min bestimmt. Die FEIB-Aktivität im Eluat wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, bestimmt.

Als Kontrolle dienten wieder eine ebenso hergestellte Präparation von FEIBA, versetzt mit Virus, jedoch ohne Behandlung mit Tensid, sowie eine ebensolche Präparation ohne Tween-80- und ohne Hitzebehandlung.

Die Analysenergebnisse sind Tabelle 2 zu entnehmen.

TABELLE 2

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktiviertem Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (FSME)

	Dauer der Behandlung (min.)								Eluat nach Lyophilisierung
	0,5	1	1,5	2	3	4	7	10	
mit Tween 80									
Virustiter (ml^{-1})	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	20
ohne Tween 80									
Virustiter (ml^{-1})	n.b.	$10^{3.6}$	n.b.	$< 10^0$	n.b.	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung									
Virustiter (ml^{-1})	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{6.2}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24

n.b. nicht bestimmt

Beispiel 3 : Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von Vaccinia-Viren)

30 ml frisch gefrorenes menschliches Citratplasma wurden bei 0 bis +4 °C aufgetaut und das dabei anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugation bei +2 °C abgetrennt. Der daraus resultierende "Kryoüberstand" wurde mit 2 IE Heparin/ml versetzt. Danach wurden die Proteine des Prothrombinkomplexes mit DEAE-Sephadex A-50 (Fa. Pharmacia) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml adsorbiert. Der Gel-Proteinkomplex wurde von der Lösung abgetrennt und jeweils mit einem Puffer 1 (4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 7 g/l NaCl, 9 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$, 500 IE Heparin/l, pH 7,5) und anschließend mit Puffer 2 (4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$/1,7 g/l NaCl, 500 IE Heparin/l, pH 7,5) gewaschen.

Das gewaschene Gel wurde nun zur Virusinaktivierung mit 1 ml Tween-80 10 min bei 60 °C suspendiert. Der Tensidlösung wurden 0,1 ml einer Vacciniavirussuspension zugesetzt. Der Virustiter wurde nach 2, 4, 6, 8 und 10 min bestimmt. Die Suspension des Gel-Proteinkomplexes in Tween-80 wurde anschließend mit einer Lösung von 1 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 30 g/l NaCl, 1000 IE Heparin/l, pH 7,0, 1:10 verdünnt. Dabei wurde der Prothrombinkomplex eluiert. Das Tensid aus dieser Lösung wurde in bekannter Weise durch Adsorption mit einer Affinitätsmatrix für die Extraktion unerwünschter Tenside aus Protein-Lösungen (Extracti-Gel® D Detergent Removing Gel der Firma Pierce) entfernt. Die Prothrombinkomplex enthaltende Lösung wurde gegen einen Puffer, enthaltend 4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$ und 8 g/l NaCl, pH 7,0, umgepuffert und lyophilisiert.

Im rekonstituierten, lyophilisierten Prothrombinkomplex wurde der Proteingehalt, sowie die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X bestimmt.

Als Kontrolle dienten ein wie oben beschrieben hergestellter Prothrombinkomplex, jedoch ohne Tensidbehandlung, sowie eine Präparation ohne Tensid- und Hitzebehandlung.

Die Resultate sind Tabelle 3 zu entnehmen.

TABELLE 3

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (Vaccinia)

	Dauer der Behandlung (min.)					Eluat nach Lyophilisierung Faktor			
	2	4	6	8	10	II	VII	IX	X
mit Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,8	0,3	1,3	1,4
ohne Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	$10^{4.0}$	$10^{3.1}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	0,7	0,6
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung Virustiter (ml^{-1})	n b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{5.3}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	2,1	1,5

n.b. nicht bestimmt

Beispiel 4: Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von FSME-Viren)

Prothrombinkomplex wurde analog zu Beispiel 3 hergestellt. Zur Behandlung des pufferfeuchten Gelproteinkomplexes mit Tween-80 wurden jedoch 0,1 ml einer FSME-Virussuspension zugesetzt. Der Virustiter wurde nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 7 und 10 min bestimmt. Im rekonstituierten lyophilisierten Prothrombinkomplex wurden der Proteingehalt sowie die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X bestimmt.

Als Kontrolle dienten ein wie oben beschrieben hergestellter Prothrombinkomplex, jedoch ohne Tensidbehandlung, sowie eine Präparation ohne Tensid- und Hitzebehandlung.

Die Resultate sind Tabelle 4 zu entnehmen.

TABELLE 4

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (FSME)

	Dauer der Behandlung (min.)								Eluat nach Lyophilisierung Faktor			
	0,5	1	1,5	2	3	4	7	10	II	VII	IX	X
mit Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	n.b.	n.b.	n.b.	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,8	0,3	1,3	1,4
ohne Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	n.b.	$10^{3.6}$	n.b.	$< 10^0$	n.b.	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	0,7	0,6
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung Virustiter (ml^{-1})	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{6.2}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	2,1	1,5

n.b. nicht bestimmt

Beispiel 5 : Stabilität des Faktor XIII beim Erhitzen in Lösung (ohne Stabilisatoren) in Gegenwart eines Tensids

Eine Plasmafraktion (Cohn I Niederschlag) wurde mit der 10-fachen Menge einer citrathaltigen Pufferlösung, pH 7,0 (13,4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 29 g/l NaCl, 20 000 KIE Aprotinin/l) gelöst. Nach Zusatz von Ammoniumsulfat bis zur 16 %igen Sättigung (bei Raumtemperatur) wurde auf 4 °C abgekühlt und das Gemisch noch 2 h gerührt. Der entstande Niederschlag wurde mit der Pufferlösung gelöst und die Fällung mit Ammoniumsulfat einmal wiederholt.

Der Niederschlag wurde in einer citrathaltigen Pufferlösung, pH 7,0 (5,4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 7 g/l NaCl, 0,1 KIE Aprotinin/l) gelöst und 10 min auf 56 °C erhitzt. Der entstandene Niederschlag aus denaturiertem Fibrinogen wurde abzentrifugiert. Der Hitzefällungsüberstand wurde durch Fällung mit 3,5 Gew./Vol.% PEG 4000 bei 4 °C von Begleitproteinen befreit. Anschließend wurde der Faktor XIII durch Zugabe von PEG 4000 bis zu einer Konzentration von 10 Gew./Vol.% bei 4 °C ausgefällt, durch Zentrifugieren abgetrennt und in 1/25 des ursprünglichen Volumens eines 0,1 Gew.%igen Natriumcitratpuffers (pH 7,0) gelöst.

Die spezifische Aktivität betrug 21 E Faktor XIII/mg Protein. Die Lösung wurde geteilt und ein Teil mit 1 Gew.% Tween 80 versetzt. Beide Lösungen wurden 6 h lang auf 60 °C erhitzt. Die Faktor XIII-Restaktivitäten nach 6 h Erhitzen betrugen 82 % ohne Tensidzusatz und 84 % mit Tensidzusatz.

Beispiel 6: Beispiel 5 wurde mit verschiedenen Tensiden in unterschiedlichen Konzentrationen wiederholt (Erhitzen: 4 h, 60 °C).

TABELLE 5

Erhitzen einer Faktor XIII-haltigen Lösung in Anwesenheit von Tensid		
Tensid	Konzentration Gew.%	FXIII-Restaktivität %
Tween 80	15	97
Triton X-100	15	91
Pluronic P 85	10	96

Die Beispiele 5 und 6 zeigen, daß eine Hitzebehandlung von Faktor XIII in Gegenwart von Tensiden durchgeführt werden kann, ohne größere Verluste an Faktor XIII-Aktivität in Kauf nehmen zu müssen.

Das folgende Beispiel 7 illustriert die überraschend verbesserte Inaktivierungskinetik eines Modellvirus durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart eines Tensids im Vergleich zur Hitzebehandlung ohne Tensidzusatz:

Beispiel 7: Inaktivierung eines Modellvirus (Sindbis) in einer Faktor XIII-haltigen Lösung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines Tensids

Eine Faktor XIII-haltige Lösung entsprechend Beispiel 5 wurde geteilt und ein Teil mit 0,3 Gew./Vol.% N-Octylglukosid versetzt.

Beide Lösungen wurden auf 60 °C erhitzt, mit 10 Vol.% einer Sindbis-Virus-Suspension versetzt (Start der Virusinaktivierungsreaktion) und bei 60 °C weiter inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben gezogen und der Virustiter bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengestellt.

TABELLE 6

Virusinaktivierung in einer Faktor XIII-haltigen Lösung mit und ohne Tensid bei 60 °C		
	Virustiter (log10)	
Dauer des Erhitzens auf 60 °C (Minuten)	ohne Tensid	mit Tensid
0	8,1	8,1
0,5	5,75	1,88
1	5,0	≤ 1,5
1,5	4,25	≤ 1,5
2	3,88	≤ 1,5
2,5	3,75	≤ 1,5
3	3,25	≤ 1,5
3,5	2,75	≤ 1,5
4	2,63	≤ 1,5
4,5	2,5	≤ 1,5
5	2,38	≤ 1,5
6	1,88	≤ 1,5
7	2,1	≤ 1,5
8,10,15,20,30	≤ 1,5	≤ 1,5

Durch den Zusatz von Tensid wird eine noch schnellere und weitgehendere Virusinaktivierung erhalten, ohne größere Verluste an Faktor XIII-Aktivität in Kauf nehmen zu müssen (vergleiche Beispiel 6).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates unter Anwendung eines T nsids und durch Erhitzen, wobei mindestens 50 % der biologischen Aktivität erhalten werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem in wässeriger Lösung vorliegenden Präparat vor dem Erhitzen mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% des biologisch verträglichen T nsids zugesetzt werden und das Tensid nach dem Erhitzen entfernt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Erhitzen bei einer Temperatur im Bereich von 55 bis 65 °C während einer Zeitdauer durchgeführt wird, die ausreicht, um infektiöse Agentien zu inaktivieren, vorzugsweise während 2 Minuten bis 100 Stunden.

3. Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen, an einen festen Träger adsorbierten Präparates durch Erhitzen unter Erhaltung von mindestens 50 % der biologischen Aktivität des Präparates, **dadurch gekennzeichnet**, daß das an dem festen Träger adsorbierte Präparat in einer Lösung eines biologisch verträglichen Tensids suspendiert, die Suspension erhitzt und gegeben nfalls das virusinaktivierte Präparat vom Träger getrennt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Lösung oder der Suspension ein Lösungsvermittler für Proteine zugesetzt wird.

5. Verfahren zum Erhöhen der Virussicherheit eines biologischen Präparates unter Erhaltung von mindestens 50 %, vorzugsweis 80 % der biologischen Aktivität, insbesondere der Virussicherheit gegenüber membranumhüllten und nicht-membranumhüllten Viren, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Präparat in wässeriger Lösung bzw. in Susp nsion - gebunden an einen festen Träger - in Gegenwart eines gelösten T nsids in einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%,

bis zu 98 Gew.% erhitzt wird.

6. Verfahren zum Stabilisieren eines biologischen Präparates während einer Hitzebehandlung, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Präparat in wässeriger Lösung bzw. in Suspension - gebunden an einen festen Träger - in Gegenwart eines gelösten, biologisch verträglichen Tensids in einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% erhitzt wird.

7. Virussichere biologische Präparation, erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die optisch klar ist.